



Potenciación de la respuesta antitumoral mediante el envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico

**MARÍA DE JESÚS LOERA ARIAS*, SANDRA CECILIA ESPARZA GONZÁLEZ*,
ARNULFO VILLANUEVA OLIVO*, ODILA SAUCEDO CÁRDENAS*, ROBERTO MONTES DE OCA LUNA***



Las células T CD8⁺ son clave importante en la respuesta inmune contra células infectadas por virus y células tumorales. El reconocimiento de cualquier proteína intracelular o viral por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ re-

quiere un procesamiento inicial citosólico a partir de los proteosomas hasta formar péptidos, los cuales son traslocados por proteínas transportadoras asociadas al procesamiento de antígenos (TAP) hacia el retículo endoplásmico (RE), en el que se ensamblan con moléculas MHC de clase I para presentarlas en la superficie celular.¹

La mayoría de los péptidos liberados por el proteosoma al citosol son rápidamente degradados por las endopeptidasas y aminopeptidasas citosólicas hasta aminoácidos antes de que logren "escapar" para unirse a TAP y entrar al RE. Se ha calculado que sólo un péptido se une a una molécula MHC de clase I de cada 10⁴ proteínas degradadas.² Esto explica la relativa poca eficacia de la

presentación de antígenos por parte de las moléculas de clase I. Además, las células de cáncer de cérvix (así como otros tumores malignos) muestran frecuentemente una disminución o, en algunos casos, la completa pérdida de expresión de las moléculas de MHC de clase I, como mecanismo de escape del sistema inmune.³

Estudios previos han mostrado que los antígenos ligados a Calreticulina (CRT), una proteína abundante de 46 KDa, se localizan en el retículo endoplásmico, con lo cual evaden la degradación citoplasmática. De esta manera, los antígenos se encuentran disponibles para su degradación en el RE, se genera un mayor número de péptidos y se montan en las moléculas de MHC de clase I. Con esta estrategia se indujo a una mejor respuesta péptido-específica de células T CD8⁺, y se potenció la respuesta antitumoral en un modelo murino de cáncer cérvico-uterino, mediante la fusión del antígeno E7 del HPV-16 a Calreticulina.^{4,5} Sin embargo, no se conoce el mecanismo de este efecto.

Para simplificar esta estrategia y determinar si las propiedades antitumorales conferidas a la Calreticulina dependen de su habilidad para diri-

□ El presente artículo está basado en la investigación "Potenciación de la respuesta antitumoral mediante el envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2010 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2010.

*Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL.

gir y retener a los antígenos fusionados a ésta en el RE, se diseñó una nueva versión de E7, con las señales necesarias para su expresión y retención en retículo endoplásmico.

Metodología

Construcción SP-E7-KDEL

El gen E7 se amplificó por medio de PCR, con la enzima *Pfx* (Invitrogen Corp., USA), a partir del plásmido PCDNA3.1 CRT-E7, y se adicionó el péptido señal de la calreticulina y la señal de retención en retículo KDEL, por medio de dos primers. El producto de PCR (SP-E7-KDEL) se subclonó en el vector Topo 2.1, posteriormente se clonó en el vector transbordador pShuttle. Por último, se realizó una recombinación homóloga entre este plásmido que portaba nuestro gen de interés y el genoma adenoviral *Ad-Easy* (Quantum Biotechnologies, Montreal, QC, Canada) en la cepa de *E. coli* BJ5183.

Obtención de partículas virales y producción a pequeña escala

Una vez que se obtuvo el genoma adenoviral Ad-SP-E7-KDEL, se realizó una transfección en la línea celular HEK293, la cual expresa de manera constitutiva el gen E1A, que se encuentra deletado en el genoma adenoviral, y es necesario para la producción de las partículas virales. Una vez que las células mostraron el efecto citopático, se procedió a cosecharlas y a preparar un extracto crudo, con el cual se infectaron más células, y se produjo una mayor cantidad de virus para los siguientes experimentos.

Detección de las proteínas recombinantes

Se realizó mediante un ensayo de western blot. Se sembraron 2×10^5 células HEK293, y se infectaron con Ad-SP-E7-KDEL, y los adenovirus Ad-CRT-E7dm y Ad-LacZ como control positivo y negati-

vo, respectivamente. A las 24 horas de postinfección, se agregó el inhibidor de proteosoma por una hora, y se realizaron los extractos de proteínas totales mediante el reactivo Proteo Jet Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Inc., USA). Se cargaron 40 mg de proteína en el gel de Acrilamida-SDS, y éste se transfirió a una membrana de PVDF. Posteriormente, la membrana se bloqueó en TBST con leche descremada por una hora, y luego de lavar en TBST se incubó con el anticuerpo primario, anti-E7 monoclonal (dilución 1:500; Zymed) por toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó la membrana, y se incubó con antirratón conjugado a HRP como anticuerpo secundario (dilución 1:3000; Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA) por una hora. Luego de esto se reveló con el sustrato Super Signal West Pico (Pierce Co., USA).

Detección de la localización celular de las proteínas recombinantes

Se sembraron 1×10^4 células HEK293 por pozo en una cámara de cultivo en portaobjetos con medio DMEM (Gibco, USA), FBS a 10% y antibióticos 1X (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA). Se incubaron a 37°C, por 24 horas, en atmósfera de CO₂ a 5% y se infectaron con los adenovirus. A las 24 horas de postinfección, se retiró el medio, se lavaron las células en PBS y se fijaron/permeabilizaron las células con metanol:acetona 1:1, y se lavaron una vez con PBS. El bloqueo se realizó con BSA, a 1% en PBS, y se incubaron con los anticuerpos primarios antiE7 (NM2; Santa Cruz) y anticalnexina (H-70; Santa Cruz) a una dilución 1:200 por dos horas, posteriormente se agregaron los anticuerpos secundarios antirratón Alexa Fluor 594 (Invitrogen Corp., USA) y anticonejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen Corp., USA), a una dilución 1:500, por una hora en solución de bloqueo. Por último, se agregó medio de montaje (Vector Burlingame, USA) H-1200 con DAPI.

Producción a gran escala y purificación de las partículas virales

Para la producción a gran escala, se cultivaron células HEK293 a una confluencia de 90%, y se infectaron con los adenovirus para alcanzar un efecto citopático completo, aproximadamente a las 72 horas. Se cosecharon las células, y se realizaron extractos crudos para liberar los virus al medio de cultivo para proceder a la purificación de éstos. La purificación de las partículas virales se realizó por medio del kit ViraBind Adenovirus Miniprep Kit (Cell Biolabs Inc, San Diego CA, USA). Una vez purificados los adenovirus, se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Aislamiento de células de bazo

Para determinar si los adenovirus recombinantes son capaces de despertar una respuesta inmune celular, se llevaron a cabo ensayos de producción de interferón *gamma* (IFN- γ) con células de bazo de ratones inmunizados. Se utilizaron ratones hembras de 6 a 8 semanas de la cepa C57BL/6 de la compañía Harlan, México, divididas en grupos de tres ratones por cada tratamiento. Se inyectaron vía i.p., con 5×10^{10} partículas virales (P.V.). A una semana de postinfección, se obtuvieron los bazos, se maceraron en un Cell Streiner (BD Pharmingen), se realizaron lavados con medio de cultivo RPMI (Gibco, USA), y se resuspendieron las células en solución de potasio-cloruro de amonio para eliminar los eritrocitos. Las células se resuspendieron en medio RPMI, y se determinó la viabilidad de las células por exclusión con azul tripiano.

Cuantificación de los niveles de liberación de IFN γ de los linfocitos en cultivo

Las células de bazo obtenidas se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos, con 5×10^6 células por pozo, y se les adicionó el péptido RAHYNIVTF (GenScript Corp, USA) de la proteína E7, el cual ya está demostrado que induce a una respuesta

inmune celular; también se les adicionaron 10 U de IL-2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), y a las 72 horas de cultivo se midieron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes con un kit de ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los niveles de IFN- γ se analizaron en un lector de ELISA a 450nm.

Ensayos de protección antitumoral

Para el experimento de protección antitumoral se inmunizaron seis ratones con 5×10^{10} P.V. por vía i.p., con los Ad-LacZ, Ad-E7, Ad-CRT-E7 y el Ad-SP-E7-KDEL. Una semana después se retaron con 5×10^4 células TC-1 por ratón, mediante una inyección subcutánea en el costado derecho. El crecimiento tumoral se estuvo monitoreando cada tercer día, y se graficó el volumen tumoral.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las muestras se realizó con el programa SPSS v.16, y con la prueba de ANOVA se compararon las diferencias entre tratamientos. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos.

Resultados

A partir de la fusión CRT-E7 (figura 1a), se diseñó una nueva versión del antígeno E7 del HPV-16, fusionado únicamente a las señales que lo envían (SP: MLLPVPLLLGLLLGL AAAL), y retengan en el retículo endoplásmico (KDEL) (figura 1b). A este gen lo denominamos SP-E7-KDEL.

Los adenovirus producidos expresan la proteína recombinante SP-E7-KDEL

Una vez construidos y caracterizados los adenovirus, se procedió a demostrar que fueran capaces de producir la proteína recombinante SP-E7-KDEL, mediante un ensayo de Western blot, con

anticuerpos específicos. Como se observa en la figura 2, tanto en las células a las que se les agregó únicamente PBS, como en las infectadas con el control negativo LacZ, no se detectó la proteína E7. En cambio, en el control positivo infectado con el adenovirus CRT-E7,⁴ se detectó la expresión de una proteína de 75 kDa, aproximadamente, que corresponde a la proteína calreticulina de 60 kDa fusionada a E7 de 15 kDa. En las células infectadas con el adenovirus Ad-SP-E7-KDEL se detectó una proteína, con una movilidad de 15 kDa, aproximadamente. Con esto se demuestra que el adenovirus SP-E7-KDEL construido es capaz de expresar la proteína recombinante SP-E7-KDEL.

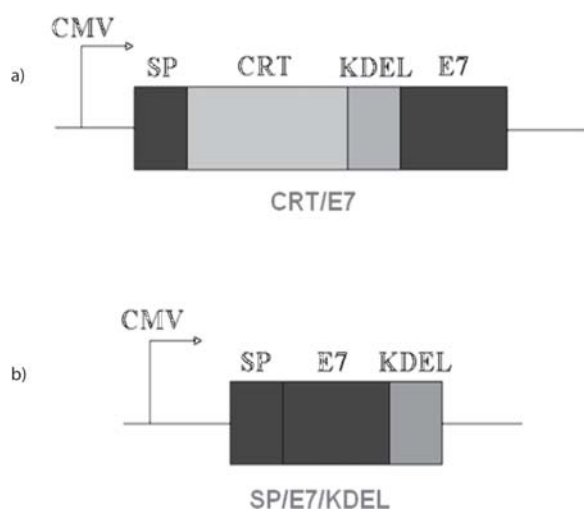


Fig. 1. Esquema de las fusiones CRT-E7 y SP-E7-KDEL: a) fusión de la proteína calreticulina al antígeno E7, se resaltan en color azul las señales de envío (SP) y retención en retículo endoplásmico (KDEL), b) fusión del antígeno E7 a las señales péptido señal (SP) y a la señal KDEL.

La expresión de la proteína recombinante SP-E7-KDEL se localiza en retículo endoplásmico

Para comprobar que el antígeno E7 estaba siendo dirigido y retenido en el retículo endoplásmico, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el que células HEK293 se infectaron con los adenovirus Ad-LacZ, Ad-E7, Ad-CRT-E7 y Ad-SP-E7-

KDEL. Como se observa en la figura 3, en el tratamiento con el Ad-LacZ no hay expresión de E7, sólo se observa la expresión de la proteína calnexina en color verde, en cambio, con el Ad-E7 se observa que la señal de E7, en color rojo, no se sobrelapa con la señal de la calnexina, en color verde, ya que la localización de la proteína silvestre es principalmente nuclear. Con el Ad-CRT-E7, la señal de E7 se colocaliza con la señal de RE en verde, y este mismo patrón lo sigue el Ad-SP-E7-KDEL, con lo que se comprueba que las señales que posee son funcionales, y el antígeno se envía y se retiene en RE.

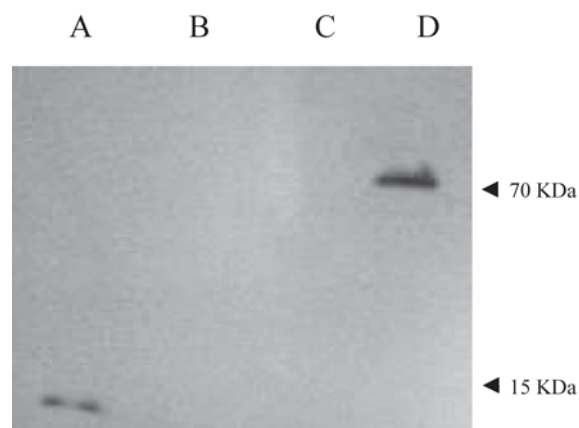


Fig. 2. Western blot demuestra la eficiente expresión de la proteína recombinante SP-E7-KDEL. En esta figura se observa la expresión de la proteína E7 en células infectadas con el adenovirus PS/E7KDEL(a), así como el control positivo CRT-E7(d). En las células infectadas con LacZ (b) y sin infectar (c) no se observó expresión.

Las secuencias adicionales al antígeno E7 incrementan la respuesta inmune celular contra E7

Como ya se ha reportado antes, el IFN- γ es una citosina importante para la respuesta inmune celular, así como para la actividad citotóxica. Por esto se evaluó si la inmunización con el vector adenoviral Ad-SP-E7-KDEL podría inducir la expresión de IFN- γ . Como se observa en la figura 4, los linfocitos de ratones inmunizados tanto con el Ad-CRT-E7, como con el Ad-SP-E7-KDEL, ge-

neraron niveles significativos de IFN- γ cuando se estimularon con el péptido de E7: RAHYNIVTF. Además, esta respuesta fue específica para E7, ya que los linfocitos de ratones, inmunizados con el adenovirus control Ad-LacZ, o con PBS, no generaron niveles significativos de IFN- γ . Este resultado indica que la inmunización con la fusión del antígeno E7, a las señales de envío y retención en RE, aumenta la respuesta de células T así como la producción de citocinas.

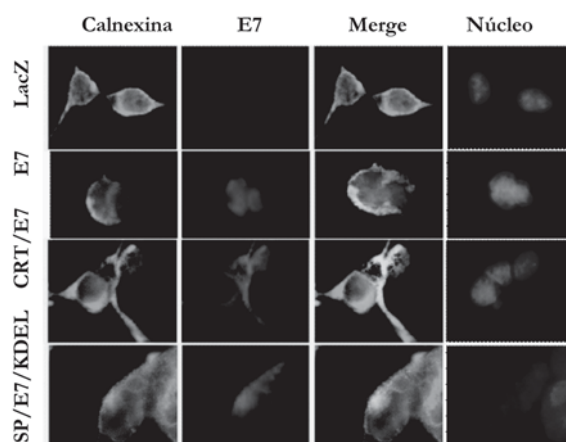


Fig. 3. El antígeno SP/E7/KDEL se expresa en retículo endoplásmico. En la primera columna, en color verde, se observa la expresión del marcador de retículo endoplásmico, calnexina; en la segunda columna se observa la expresión del antígeno E7 en color rojo; en la tercera columna se observa el sobrelapamiento de las imágenes de las señales de E7 y calnexina, y en la última fila se observan los núcleos en azul.

Las secuencias adicionadas al antígeno E7 incrementan su efecto antitumoral en un modelo *in vivo*

Puesto que el objetivo principal de la creación de esta vacuna es evaluar el efecto antitumoral en el modelo murino, se procedió a inmunizar a grupos de ratones vía i.p., con los diferentes adenovirus, una semana después se retaron con las células TC-1, y se monitoreó el crecimiento tumoral. Como se observa en la figura 5, la inmunización con el Ad-SP-E7-KDEL generó un potente efecto antitumoral, lo cual se evidenció por la ausencia del crecimiento tumoral en 100% de los ratones,

en tanto que todos los ratones que recibieron la inmunización con el Ad-CRT-E7 desarrollaron un pequeño tumor que después de cuatro semanas eliminaron. En contraste, los ratones inmunizados con el Ad-E7 y el Ad-LacZ desarrollaron tumor. Con esto concluimos que el envío y retención del antígeno E7 en el RE genera una potente respuesta antitumoral *in vivo*. Estos resultados sugieren

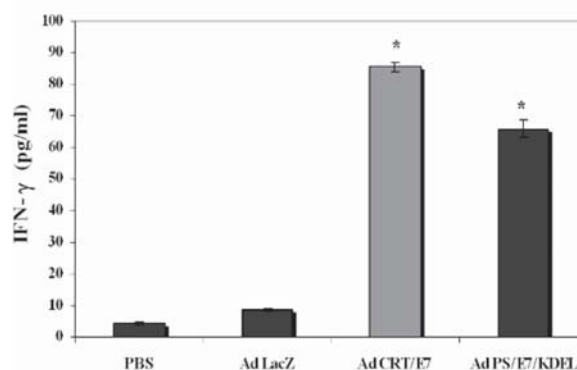


Fig. 4. Niveles de IFN- γ en cultivo de linfocitos inmunizados. En esta figura se observa la liberación de IFN- γ por linfocitos de ratones inmunizados con los distintos adenovirus. * $P < 0.05$.

que la inmunización con el antígeno SP-E7-KDEL es una excelente estrategia para generar una buena respuesta inmune antitumoral.

Conclusiones

- La adición de un péptido señal y una señal de retención en retículo endoplásmico le confiere un potente efecto antitumoral al antígeno E7.
- El efecto antitumoral de la Calreticulina está conferido por su capacidad de llevar y retener los antígenos al retículo endoplásmico, mediado por el péptido señal y la secuencia de retención a retículo endoplásmico.

Discusión

En la actualidad, gran parte de la investigación está enfocada al estudio del cáncer, y en especial al desarrollo de nuevas terapias que ayuden a la erra-

dicación de esta enfermedad. En este trabajo se desarrolló una vacuna con base en la tecnología llamada terapia génica, en la que por medio de la inmunización con un vector, en este caso un adenovirus, se introduce material genético que dirige la expresión de antígenos inmunogénicos que estimulen al sistema inmune, para despertar una respuesta específica contra células tumorales que expresen estos antígenos.

Debido a que el cáncer cérvico-uterino está íntimamente relacionado con la infección con HPV-16, las células cancerígenas expresan proteínas exclusivas del virus, lo que las diferencia de las células normales, y las convierte en un blanco para dirigir una respuesta inmune antitumoral. De estas proteínas, el antígeno E7 es una de las que se expresan en mayor cantidad en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que gran parte de la

E7, lo anterior probado en un modelo murino.⁴ Con el objetivo de determinar si la mayor parte de las propiedades antitumorales conferidas a la calreticulina dependen de su habilidad para enviar y retener antígenos en el retículo endoplásmico (RE), creamos un adenovirus que expresa una nueva versión de E7, la cual lleva la señal requerida para dirigirse al retículo endoplásmico (SP: MLLPVPL LLGLLLGLAAL) y la de retención en RE (KDEL).

Para llevar a cabo esto, se construyó y caracterizó el adenovirus capaz de dirigir la expresión del gen recombinante SP-E7-KDEL, se detectó la expresión de la proteína de fusión mediante Western blot, y se determinó su localización demostrándose que se expresaba en RE, a diferencia de la E7 silvestre, cuya expresión fue nuclear. Con los resultados anteriores, podemos concluir que el efecto antitumoral atribuido a la calreticulina es conferido, principalmente, por sus señales SP y KDEL, las cuales permiten que los antígenos entren y se mantengan en el RE. Aun cuando el mecanismo mediante el cual la generación de epítopes en el RE aún no es bien entendido, una posibilidad es que la secuencia KDEL provoque que los antígenos permanezcan más tiempo en este sitio, incrementa sus posibilidades de degradación y, como consecuencia, la generación de péptidos y su unión a moléculas MHC.^{6,7} Otra ventaja del uso de esta estrategia sería prevenir cualquier efecto adverso que causara la sobreexpresión de la calreticulina, por ejemplo, con su rol en el almacenamiento de Ca^{2+} intracelular.⁸

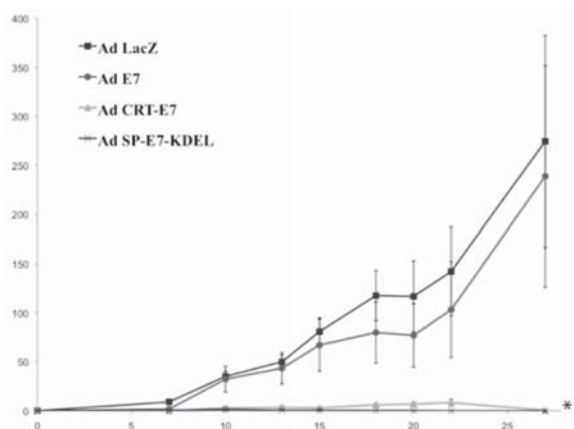


Fig. 5. Efecto antitumoral del adenovirus SP-E7-KDEL. Grupos de seis ratones recibieron una inmunización con los distintos adenovirus, y una semana después fueron retados con las células tumorales TC-1. En la gráfica se representa el promedio del crecimiento tumoral de cada grupo. * $P < 0.05$

investigación para el desarrollo de vacunas antitumorales se basan en el uso de éste.

Nuestro grupo de trabajo demostró, anteriormente, que la inmunización con un adenovirus que expresa al antígeno E7 fusionado al potenciador de la respuesta inmune calreticulina generaba una potente respuesta inmune antitumoral específica contra las células TC-1 que expresan

Resumen

En el retículo endoplásmico, las moléculas del MHC de clase I se asocian con los epítopes para inducir la respuesta inmune celular. La mayoría de los antígenos se degradan en el citoplasma, y tan sólo unos cuantos epítopes llegan al RE. En este trabajo demostramos que fusionando el antígeno E7 al péptido señal y a la señal de retención en RE, KDEL, los antígenos son enviados y

retenidos en el RE, con la consecuente mejora en la respuesta inmune antitumoral. Estos resultados pueden aplicarse en clínicas importantes.

Palabras clave: Retículo endoplásmico, Adenovirus, VPH, Cáncer cérvico-uterino.

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is where the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I molecules are loaded with epitopes to cause an immune cellular response. Most of the protein antigens are degraded in the cytoplasm to amino acids and few epitopes reach the ER. Antigen targeting of this organelle by Calreticulin fusion avoids degradation and enhances the immune response. This work demonstrated that just by adding a signal peptide and the KDEL sequence, antigens can be targeted and retained in the ER with a consequent enhancement of immune response and tumor protection. These results will have significant clinical applications.

Keywords: Endoplasmic reticulum, Adenovirus, HPV, Cervical uterine cancer.

Referencias

1. Purcell A.W., Elliott T. Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Curr Opin Immunol.* 2008 Feb;20(1):75-81.
2. Yewdell J.W. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 2001 Jul;11(7):294-7.
3. Kageshita T., Hirai S., Ono T., Hicklin D.J., Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol.* 1999 Mar;154(3):745-54.
4. Gomez-Gutiérrez J.G., Elpek K.G., Montes de Oca-Luna R., Shirwan H., Sam Zhou H., McMasters K.M. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jul;56(7):997-1007.
5. Hsieh C.J, Kim T.W., Hung C.F., et al. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine.* 2004 Sep 28;22(29-30):3993-4001.
6. Sheritt M., Cooper L., Moss D.J., Kienzle N., Altman J., Khanna R. Immunization with tumor-associated epitopes fused to an endoplasmic reticulum translocation signal sequence affords protection against tumors with down-regulated expression of MHC and peptide transporters. *Int Immunol.* 2001 Mar;13(3):265-71.
7. Leifert J.A., Rodríguez-Carreño M.P., Rodríguez F., Whitton J.L. Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev.* 2004 Jun;199:40-53.
8. Michalak M., Corbett E.F., Mesaeli N., Nakamura K., Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999 Dec 1;344 Pt 2:281-92.

Recibido: 01 de agosto de 2010

Aceptado: 01 de septiembre de 2010